

CANNABINOIDES Y NEUROPROTECCION EN LA ENCEFALOPATIA HIPOXICO-ISQUEMICA NEONATAL

Dr. Jose Martinez Orgado. Neonatología. Hospital Universitario Puerta de Hierro Majadahonda. Madrid

Cerca de un millón de recién nacidos a término, frecuentemente sanos hasta ese momento, fallecen cada año en el mundo por complicaciones derivadas de la encefalopatía hipóxico-isquémica neonatal (EHIN). Además del riesgo de muerte, la EHIN representa una temible fuente de secuelas físicas y psíquicas para los niños afectados, con los consiguientes costes sociales (de falta de desarrollo pleno del enfermo y su familia) y económicos.

DAÑO CEREBRAL HIPOXICO-ISQUEMICO

Tras un episodio HI se pone en marcha una cascada de acontecimientos que culmina con la muerte celular cerebral. Inicialmente, la disfunción de las bombas iónicas dependientes de ATP induce la acumulación intracelular de cationes (especialmente Na⁺ y Ca²⁺) que alteran la polaridad de la membrana neuronal, causa edema citotóxico, activa varias enzimas (fosfolipasas, endonucleasas, proteasas, caspasas, y NO sintasa, que inducen daño estructural, agravan el déficit energético, aumentan el estrés oxidativo y participan en mecanismos de apoptosis) y finalmente provoca la liberación y acumulación de aminoácidos excitotóxicos como el glutamato, que agrava la entrada masiva de Ca²⁺ por la apertura de canales acoplados a los receptores NMDA, AMPA y metabotropos, así como la síntesis masiva de NO al inducir la expresión de la sintetasa inducible de NO (iNOS). Durante la reperfusión se produce además un daño oxidativo, amplificado por la producción masiva de NO -que determina la síntesis de peroxinitrito-, así como por la respuesta inflamatoria; el aumento precoz de la producción y liberación de citoquinas, agravada por la acumulación de glutamato, induce daño cerebral directo, especialmente glial; potencia la excitotoxicidad y el daño oxidativo; induce mecanismos apoptóticos; y compromete la vascularización cerebral y la puesta en marcha de mecanismos de neuroreparación.

El cerebro neonatal es particularmente vulnerable a la HI debido a su alta tasa metabólica y de extracción de oxígeno, junto a la inmadurez de los mecanismos de recaptación de glucosa; el predominio de mecanismos proapoptóticos ligados a la plasticidad del cerebro en desarrollo; la inmadurez de los mecanismos de autorregulación del flujo cerebral; y el activo metabolismo férrico glial, que lo hace más susceptible al estrés oxidativo. Además, el cerebro inmaduro es particularmente susceptible a los efectos del glutamato. Crece la importancia atribuida en los últimos años a los mecanismos inflamatorios en la génesis del daño cerebral perinatal. Así, se ha demostrado un aumento de la incidencia de PCI en relación con la existencia de infección materna o placentaria, o de la elevación de citoquinas en sangre o líquido amniótico. Las citoquinas, además de hipersensibilizar a los efectos de la HI, aumentan el estrés oxidativo e inducen daño endotelial, agravando la alteración de la autorregulación cerebral, por lo que inciden directamente en la fisiopatología de la PCI. Por otra parte, el cerebro inmaduro ha demostrado una enorme capacidad plástica de recuperación tras una HI, incrementando la producción de precursores neuronales en la zona subventricular, que migran a las zonas neocorticales lesionadas. Este proceso coincide con la proliferación y migración de células gliales, que se han demostrado imprescindibles para la supervivencia de los precursores neuronales migrados. Así, los astrocitos se han revelado pieza clave para garantizar la neuroreparación: acumulan glucógeno, garantizando la disponibilidad de una fuente de energía para las neuronas; sintetizan y liberan factores neurotróficos; y, finalmente, ayudan a reducir la acumulación perineuronal de NO y otros oxidantes, y de citoquinas, y son los principales responsables de evitar la acumulación de glutamato. La reducción de la celularidad astrocítica sería un factor de agravamiento de la lesión cerebral, por lo que se considera que las estrategias protectoras de astrocitos serían también neuroprotectoras.

NEUROPROTECCION

Las diferentes estrategias de neuroprotección ante la HI se ven condicionadas por un lado por la existencia de una "ventana terapéutica", definida como un período de tiempo (entre 6 a 10 horas) que transcurre desde que se produce el episodio HI hasta que se activan los diferentes mecanismos que regulan la muerte neuronal tardía, y por otro lado por la gran complejidad de la fisiopatología de la lesión cerebral HI, que implica que sólo terapéuticas que actúen simultáneamente a distintos niveles, sean eficaces. Un ejemplo sería la hipotermia. Sin embargo, aunque la hipotermia ha demostrado efectos beneficiosos en neonatos asfícticos, estos beneficios son parciales y sólo en casos moderados. Por ello, se afianza la creencia sobre la necesidad de terapias combinadas que, sumando fuerzas, consigan reducir eficazmente el daño post-HI.

Un tratamiento neuroprotector para la EHIN, por tanto, debería actuar sobre excitotoxicidad, inflamación y estrés oxidativo, ser neuro y glioprotector, y no ser tóxico a corto ni largo plazo (no comprometiendo el desarrollo y

maduración cerebral). Además, idealmente debería actuar también sobre el daño extracerebral, ya que éste agrava el daño cerebral y compromete la supervivencia.

LOS CANNABINOIDES

En este sentido, los cannabinoides ganan terreno como candidatos a ser una eficaz terapia multifactorial de la lesión cerebral por HI. Los ligandos cannabinoides endógenos conforman, junto con sus receptores, un sistema que participa en la regulación de la transmisión sináptica, con efectos moduladores sobre diferentes procesos fisiológicos en el sistema nervioso y también en el sistema inmune y cardiovascular. En el sistema nervioso, los cannabinoides participan en la regulación de la actividad motora, memoria, motivación, nocicepción, apetito y termorregulación, entre otros. Los receptores para cannabinoides denominados CB1, responsables de los efectos psicoactivos, son de los más abundantes y ubicuos en el sistema nervioso central, y aparecen ya en etapas fetales muy precoces, participando en procesos de neuroproliferación y mielinización. Otros receptores ya secuenciados son los CB2, de localización preferente en tejido linfóide, pero que también se encuentra en el sistema nervioso central, especialmente el inmaduro, en células microgliales y algunas neuronas. Existen pruebas de que los cannabinoides también interactúan con otros receptores, algunos conocidos, como los vanilloides (VR1), y otros por determinar.

Varias características de los cannabinoides justifican su potencial neuroprotector: la activación de los receptores CB conduce al cierre de los canales de Ca^{2+} , limita la producción tóxica de NO, la liberación de glutamato y de citoquinas, y tiene un efecto vasorregulador; además, son potentes antioxidantes, y han mostrado efectos proliferativos y remielizantes. Finalmente, los cannabinoides han demostrado proteger a los astrocitos ante diversos estímulos proapoptóticos. Así, diversos agonistas cannabinoides han demostrado reducir el daño cerebral en modelos de infarto en animales adultos, sin ser administrados hasta 48 h después del episodio HI.

Nuestro grupo ha demostrado el potente efecto neuroprotector de un cannabinoide agonista CB1-CB2, el WIN55212, en modelos *in vitro* e *in vivo* de EHIN en rata recién nacida. Recientemente hemos comprobado además el efecto neuroproliferativo del WIN55212 en este modelo. Sin embargo, existen pruebas recientes que sugieren que la sobreactivación de receptores CB1 en el cerebro inmaduro puede ser lesiva para éste, por lo que se hizo necesario investigar en el papel neuroprotector de cannabinoides no agonistas CB1.

EL CANNABIDIOL

Así, nuestro grupo inició el estudio del potencial neuroprotector del cannabidiol (CBD), el principal componente no psicoactivo del *Cannabis sativa*. El CBD no tiene actividad CB1 demostrable, pero según nuestros estudios sí tiene actividad CB2 en el cerebro inmaduro. En un modelo *in vitro* de EHIN, demostramos que el CBD reduce la necrosis y la apoptosis en el cerebro inmaduro, mediante la inhibición de la liberación de glutamato y citoquinas así como la modulación de la inducción de iNOS y COX-2. Además, el CBD es un potente antioxidante debido al anillo fenólico de su estructura. Empleando un modelo *in vivo* de HI con lechón recién nacido –hipoxia más oclusión carótidea transitoria-, considerado muy próximo a la situación clínica real, demostramos que la administración de CBD a 0.1 mg/kg *iv* 15 min tras un episodio HI reduce la lesión cerebral, efecto asociado a la disminución de la disfunción hemodinámica cerebral, la mejoría de la actividad metabólica y eléctrica, la reducción del edema cerebral y la prevención de convulsiones. El CBD demostró además no sólo una ausencia de efectos secundarios significativos, sino que se asoció a efectos beneficiosos cardiovasculares y respiratorios. Estudios posteriores demostraron que su efecto beneficioso progresa en los 3 días posteriores a la HI, normalizando funcionalmente la actividad cerebral. Asimismo, en este modelo a corto plazo se demostró el papel protector de astrocitos del CBD.

Estudios actuales en modelos en rata con CBD a 1 mg/kg han ofrecido datos que avalan que el efecto neuroprotector del CBD se mantiene e incluso progresa hasta la edad adulta. Asimismo, existen pruebas iniciales que sugieren que el CBD tendría también un efecto pro-proliferativo sobre células cerebrales.

Su eficacia siendo administrado post-HI, su efecto mantenido a corto y largo plazo y la ausencia de efectos secundarios significativos convierten al CBD en un candidato ideal para ser empleado en humanos. Queda, no obstante, por definir la dosis óptima, la ventana temporal terapéutica y los posibles efectos sinérgicos con hipotermia.

BIBLIOGRAFIA SELECCIONADA

- Allan SM, Rothwell NJ. Cytokines and acute neurodegeneration. *Nat Rev Neurosci* 2001;2:734-740
- Alvarez FJ, Lafuente H, Rey-Santano MC, Mielgo VE, Gastiasoro E, Rueda M, Pertwee RG, Castillo AI, Romero J, Martínez-Orgado J. Neuroprotective effects of the non-psychoactive cannabinoid cannabidiol in hypoxic-ischemic newborn piglets. *Pediatr Res* 2008;64:653-658.
- Cilio MR, Ferriero DM. Synergistic neuroprotective therapies with hypothermia. *Semin Fet Neonat Med* 2010; doi:10.1016/j.siny.2010.02.002
- Fernández-López D, Martínez-Orgado J, Nuñez E, Romero J, Bonet B, Lorenzo P, Moro MA, Lizasoain I. Characterization of the neuroprotective effect of the cannabinoid agonist WIN-55212 in an ex vivo model of hypoxic-ischemic brain damage in newborn rats. *Pediatr Res* 2006;60:169-173.
- Fernandez-Lopez D, Pazos MR, Tolon RM, Moro MA, Romero J, Lizasoain I, et al (2007) The cannabinoid agonist WIN55212 reduces brain damage in an in vivo model of hypoxic-ischemic encephalopathy in newborn rats. *Pediatr Res* 62:255-260.
- Fernández-López D, Pradillo JM, García-Yébenes I, Martínez-Orgado J, Moro MA, Lizasoain I. The cannabinoid WIN55212-2 promotes neural repair after neonatal hypoxia-ischemia. *Stroke* 2010;41:2956-2964
- Ferriero DM. Neonatal brain injury. *N Engl J Med* 2004;351:1985-1995
- Graham EM, Ruis KA, Hartman AL, Northington FJ, Fox HE. A systematic review of the role of intrapartum hypoxia-ischemia in the causation of neonatal encephalopathy. *Am J Obstet Gynecol* 2008;12:587-595
- Johnston MV. Excitotoxicity in neonatal hypoxia. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev* 2001;7:229-234.
- Lafuente H, Alvarez FJ, Pazos M.R, Alvarez A, Rey-Santano MC, Mielgo V, Murgia-Esteve X, Hilario E, Martínez-Orgado J. Cannabidiol reduces brain damage and improves functional recovery after acute hypoxia-ischemia in newborn pigs. *Pediatr Res* 2011;70:272-277.
- Martínez Orgado J, Fernández López D, Bonet B, Lizasoain I, Romero J. El sistema cannabinoide y su importancia en el período perinatal. *An Pediatr (Barc)* 2005;63:433-440.
- Martínez Orgado J, Fernández-Ruiz J, Romero J. The endocannabinoid system in neuropathological states. *Int Rev Psychiatr* 2009;21(2):172-180.
- Martínez-Orgado J, Fernández-López D, Lizasoain I, Romero J. The seek for neuroprotection: introducing cannabinoids. *Recent Pat CNS Drug Discov* 2007;2:131-139
- Mechoulam R, Lichtman AH. Stout guards of the central nervous system. *Science* 2003; 302(5642):65-67.
- Mechoulam R, Peters M, Murillo-Rodriguez E, Hanus LO. Cannabidiol-recent advances. *Chem Biodivers* 2007;4:1678-1692.
- Ong J, Plane JM, Parent JM, Silverstein FS. Hypoxic-ischemic injury stimulates subventricular zone proliferation and neurogenesis in the neonatal rat. *Pediatr Res* 2005;58:600-606.
- Pertwee RG, Howlett AC, Abood ME, Alexander SPH, Di Marzo V, Elphick MR, et al. International union of basic and clinical pharmacology. LXXIX. Cannabinoid receptors and their ligands: beyond CB1 and CB2. *Pharmacol Rev* 2010;62:588-631.
- Pertwee RG. The pharmacology and therapeutic potential of cannabidiol, in: Di Marzo, V. (Ed), *Cannabinoids*. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, 2004;pp. 32-83.
- Takuma K, Baba A, Matsuda T. Astrocyte apoptosis: implications for neuroprotection. *Prog Neurobiol* 2004;72:111-127
- Wilkinson DJ, Thayyil S, Robertson NJ. Ethical and practical issues relating to the global use of therapeutic hypothermia for perinatal asphyxial encephalopathy. *Arch Dis Child Fetal Neonat Ed* 2011;96:F75-F78.